

臭氧化海水对于弧菌 DNA 的损伤作用

宫小明^{1,2}, 孙 军¹, 刘 萍², 刘 琪², 李 健²

(1. 潍坊出入境检验检疫局 山东 潍坊 261041; 2. 中国水产科学院 黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要:用琼脂糖电泳法分别检测了臭氧化海水对溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、飘浮弧菌(*Vibrio natriegen*) 菌体内 DNA 和经碱性裂解法抽提后得到的裸露 DNA 的损伤作用。结果表明,臭氧化海水对 DNA 有很强的损伤和降解作用,在电泳图谱上表现为 DNA 带的加宽和弥散;臭氧化海水对裸露 DNA 的损伤作用,在电泳图谱上表现为 DNA 带荧光强度的增强和出现长长的拖尾。

关键词:臭氧;弧菌属(*Vibrio*);DNA

中图分类号:Q89

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2006)10-0001-03

20 世纪 70 年代以来,臭氧作为氯的替代品被广泛应用于污水处理、水产养殖中,其中主要是利用它的强氧化性达到消毒、杀菌的目的。Kozo^[1]选择碱基组成已经了解、结构比较简单的大肠杆菌质粒 pBR DNA 作为研究对象,研究臭氧对于环状质粒 DNA 的损伤作用,对于组成比较复杂的弧菌基因组 DNA 的损伤还没有人涉及过。并且研究的是成分比较简单的缓冲液体系,臭氧在实际应用过程中,往往是在组成比较复杂的海水中,臭氧在其中发生复杂的氧化还原反应,特别是海水中大量 Br⁻ 和 Cl⁻ 的存在,使臭氧的氧化生成物中含有大量的溴、氯氧化物^[2],这些氧化物对于生物体来说具有很强的毒性,所有这些综合起来将对生物体的遗传物质产生何种影响也未见报道。电离辐射、紫外线、臭氧和环境污染物都可以引起 DNA 单链和双链断裂,严重的断裂将不能被修复并很可能会致癌、致畸、致突变,甚至引起生物体的死亡。作者通过臭氧化海水对不同状态下弧菌 DNA 链断裂损伤程度的研究,为臭氧在海水养殖病害防治的应用及环境生态毒理学研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

飘浮弧菌(*Vibrio natriegen*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 均来自中国海洋大学微生物实验室。

1.1.2 臭氧化海水的制备

所有的操作都在室温下进行(19~21℃),将沙滤海水注入臭氧发生器(北京聚通韩兴技术发展有限公司提供,产臭氧量 12~15 g/h),臭氧化海水从

出水口流出。用美国产 942-094 型臭氧浓度分析仪进行臭氧浓度测定。

1.2 方法

1.2.1 臭氧化海水对于细胞内 DNA 的损伤作用

(1) 将在 2216E 培养基上过夜培养的溶藻胶弧菌、副溶血弧菌、飘浮弧菌用 3 mL 无菌的生理盐水洗脱下来,取 2 mL 菌液加入到 5 mL 的离心管中,以 5 000 r/min 的转速,离心 10 min,倒掉上清液。

(2) 取 3 mL 质量浓度为 2.60 mg/L 的臭氧化海水加入到含有菌体 5 mL 的离心管中,震荡混匀,作用 1 h 后,加入 1 mol/L 的 Na₂S₂O₃ 终止反应。

(3) 取 1 mL 经过臭氧处理后的菌液,加入到 1 mL 的离心管中,以 5 000 r/min 的转速,离心 10 min,倒掉上清液,加入 25 μL pH 8.0 的 TE 溶液,震荡使菌体完全悬浮。加入 2 μL 裂解液(2 mol/L 的 NaOH 与 10% 的 SDS 等体积混匀),放在 4℃ 的冰箱中,静置 10 min。

(4) 取裂解后的菌液 5 μL,经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察并照相。

1.2.2 臭氧化海水对细胞外 DNA 的损伤

(1) 将活化好的弧菌,加入 4 mL 无菌生理盐水,在涡旋混匀器上震荡,将菌体洗脱下来。

(2) 取 1 000 μL 洗脱液,加到 Eppendorf 管中,

收稿日期:2005-05-15;修回日期:2006-03-26

基金项目:国家科技攻关项目(2004BA526B02);山东省科技发展计划项目(2003-4-1)

作者简介:宫小明(1976-),男,山东莱西人,硕士,研究方向为海洋生物学,电话:0536-2965689, E-mail: gongxiaoming@yahoo.com

8 000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液。

(3) 加入 500 μ L 抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 为 8.0; 0.1 mol/L EDTA, pH 为 8.0)。

(4) 加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 200 mg/L 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴消化。

(5) 冷却后, 加入等体积的酚-酚:氯仿-氯仿各抽提 1 次, 加 1/25 体积的 5 mol/L NaCl, 再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA 30 min。

(6) 70% 的乙醇洗涤沉淀 1 次, 晾干后用 80 μ L 的双蒸水溶解, -4 $^{\circ}$ C 下保存。将溶有 DNA 样品的双蒸水平均分配到 4 个 Eppendorf 管中, 取质量浓度为 0, 0.69, 1.09, 1.35 mg/L 的臭氧化海水各 100 μ L 分别加入到含有 DNA 样品的 Eppendorf 管中, 震荡混匀, 静置 30 min。

(7) 经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下观察并照相。

2 结果与讨论

2.1 臭氧化海水对于细胞内 DNA 的损伤作用

从电泳图谱上来看, 经过质量浓度为 2.60 mg/L 的臭氧化海水作用 1 h 后, 3 株弧菌的 DNA 样品均出现弥散现象, 其中飘浮弧菌的 DNA, 已经变得非常模糊, 基本上已经被完全降解。这说明臭氧对 DNA 有着十分强烈的降解作用。经臭氧处理后的 DNA 在由负极向正极迁移的过程中, DNA 的带宽明显加宽。这是由于臭氧可以透过细胞膜, 作用于弧菌 DNA, 使 DNA 链断裂, 产生一些小的片段, 反映在电泳图谱上就是 DNA 带出现了更多向正极迁移的部分。

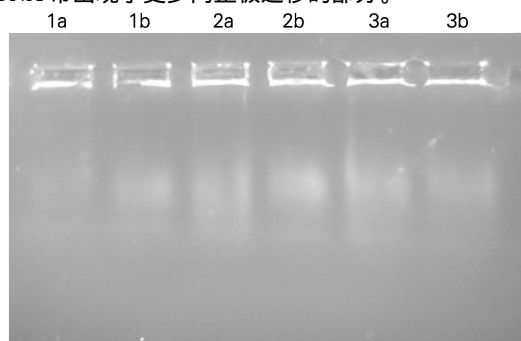


图 1 弧菌菌体经质量浓度为 2.6 mg/L 的臭氧化海水处理后的 DNA 琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *Vibrio*

DNA after treating cell with ozonated seawater (2.6 mg/L)

1. 飘浮弧菌; 2. 副溶血弧菌;

3. 溶藻胶弧菌 a. 臭氧水处理; b. 对照

1. *Vibrio natriegen*; 2. *Vibrio parahaemolyticus*; 3. *Vibrio alginolyticus*; a. treated by ozonated seawater; b. control

2.2 臭氧化海水对裸露 DNA 的损伤

从图 2 电泳图谱上可以看出, DNA 带的荧光强度显著增强, 并且出现了长长的尾部。臭氧处理组与对照组的 DNA 在荧光强度及 DNA 带的长度上存在着很大的差异, 但是臭氧处理各个浓度间的 DNA 带差异不是很大, 这说明 0.69 mg/L 的臭氧浓度和 1.35 mg/L 的臭氧浓度对弧菌 DNA 的作用效果基本相同。Ostling 等^[3]应用溴化已锭 (EB) 染色能显示遇碱不稳定位点和明显断裂, 每个受损细胞在电泳时, 其 DNA 从核中向阳极运动, 形成一个亮的荧光头部和尾部, 形似彗星, 其尾长及尾荧光强度与受试物 DNA 断裂数目相关。Olive 等^[4]报道, 断裂 DNA 数目变化 4 倍时, 其尾长仅变化 21%, 而尾中荧光强度几乎增加一倍, 未受损细胞的 DNA 则呈一个圆形的头部, 无尾。

经臭氧处理后的 DNA 荧光强度出现加强, 是由于臭氧溶于水后, 迅速分解产生羟自由基 ($\cdot$ OH), $\cdot$ OH 是一种重要的活性氧, 具有比臭氧更强的氧化能力, 可以攻击 DNA 分子的组成部分嘌呤环和嘧啶环, 其中腺嘌呤的 C-4、C-5 位最容易受到羟自由基进攻。羟自由基进攻嘌呤碱基和嘧啶碱基是破坏核酸造成 DNA 断键损伤的重要原因之一。臭氧攻击鸟嘌呤和胸腺嘧啶的嘌呤及嘧啶环, 导致这些位点上的氢键发生断裂。氢键的断裂使 DNA 双螺旋链上出现许多“空泡”结构, 这种含有“空泡”结构的 DNA 在紫外灯下出现明显的荧光强度增强的现象。

臭氧处理组与对照组的 DNA 在电泳图谱上存在的另一主要差异是: 处理后的弧菌 DNA 的明亮的头部与对照相比较稍稍靠后, 这可能是由于臭氧处理 DNA 引起其空间结构或者所带电荷的改变, 导致迁移率的改变。

将图 1 和图 2 进行比较可以发现, 图 2 中用 1.35 mg/L 的臭氧化海水处理 30 min, 还不足以将弧菌 DNA 完全降解, 只是使 DNA 在构象上有所改变。而图 1 中用 2.60 mg/L 的臭氧化海水处理 1 h, 弧菌 DNA 降解的比较厉害, 尤其是飘浮弧菌的 DNA, 经过臭氧化海水处理以后已经变得非常模糊。

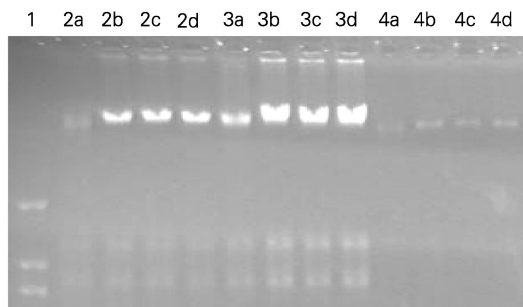


图2 用臭氧化海水处理弧菌 DNA 的琼脂糖电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of *Vibrio*

DNA after treating DNA with ozonated seawater

a. 0 mg/L; b. 0.69 mg/L; c. 1.09 mg/L; d. 1.35 mg/L

1. Marker; 2. 飘浮弧菌; 3. 副溶血弧菌; 4. 溶藻胶弧菌

1. Marker; 2. *Vibrio natriegen*; 3. *Vibrio parahaemolyticus*;

4. *Vibrio alginolyticus*

国外曾经有人对臭氧对遗传物质 DNA 的影响进行过研究。Kozo 等^[1]用琼脂糖电泳法研究臭氧对于大肠杆菌环状质粒 DNA 的损伤作用,臭氧能够使环状质粒 DNA 在特定的位点发生断裂,由环状闭合的超螺旋结构变位开放的线状结构。反映在电泳图片上是随着臭氧处理时间的延长,原来的质粒带消失,取而代之的是两条低迁移率的 DNA 带。这个现象表明臭氧能够扩散进入细胞,与细胞内的物质发生反应。

臭氧与 DNA 等大分子物质反应,如果这些与臭氧反应后的碱基被还存活的细胞所吸收,用来合成新

的核酸,就有可能在它的后代中找到发生变异的个体,这就是臭氧的遗传毒性。另外,臭氧对微生物、植物、昆虫、哺乳动物的致突变作用,及对敏感生物具有潜在的致畸及致癌作用都是通过臭氧对遗传物质的作用而达到的。精子、卵子、胚胎等对臭氧的作用都比较敏感,经过臭氧处理后,对种质到底会产生何种影响,根据养殖对象的不同以及水体的污染程度选择多大的浓度都需要在以后的研究中进一步的探讨。

参考文献:

- [1] Kozo I. Effect of ozone on plasmid DNA of *Escherichia coli* in situ [J]. **Wat Res**, 1987, 21(7): 823-827.
- [2] Williams P M. Ozonation of seawater: Preliminary observation on the oxidation of bromide, chloride and organic carbon [J]. **Water Research**, 1978, 12: 385-388.
- [3] Osting O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1990, 123: 291-298.
- [4] Olive P L, Banath J P, Durard R E, et al. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay [J]. **Radiat Res**, 1995, 122(1): 86-94.

Damage of ozone-produced oxidant to *Vibrio* DNA

GONG Xiao-ming^{1,2}, SUN-Jun¹, LIU-Ping², LIU-Qi², LI-FJian²

(1. Weifang Export and Import Inspection Bureau, Weifang 261041, China; 2. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: May, 15, 2005

Key words: ozone; *Vibrio*; DNA

Abstract: The damage of ozonated seawater to DNA *in vivo* and *in vitro* is investigated by the method of agarose gel electrophoresis. The results indicate that ozonated seawater can damage and degrade *Vibrio* DNA greatly. Seen from the electrophoresis pattern, DNA breadth becomes boardened and dispersion. The damage of ozonated seawater to exposed DNA showing in the electrophoresis pattern is reflected by fluorescent intensification and long tail.

(本文编辑:张培新)